



(19) RU (11) 2 140 450 (13) C1
(51) Int. Cl.⁶ C 12 N 1/20, C 12 P 13/06//(C
12 N 1/20, C 12 R 1:19)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 97117875/13, 29.10.1997

(46) Date of publication: 27.10.1999

(98) Mail address:
113545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, d.1,
GNII Genetika

(71) Applicant:
Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij
institut genetiki i selektsii promyshlennych
mikroorganizmov

(72) Inventor: Gusyatiner M.M.,
Lunts M.G., Ivanovskaja L.V., Rostova
Ju.G., Bachina T.A., Akhverdjan V.Z., Khurges
E.M., Livshits V.A., Kozlov Ju.I., Debabov V.G.

(73) Proprietor:
Zakrytoe aktsionernoje obshchestvo
"Nauchno-issledovatel'skij institut
"Adzhinomoto-Genetika" (ZAO "AGRI")

(54) STRAINS OF BACTERIUM ESCHERICHIA COLI - PRODUCERS OF L-LEUCINE (VARIANTS)

(57) Abstract:

FIELD: microbiological industry.
SUBSTANCE: invention relates to new strains
E. coli VKPM B-7386 and E. coli VKPM B-7388
producing L-leucine that are generated by
selection of strains exhibiting the

resistance to L-valine, 4-azaleucine,
3-hydroxyleucine and L-leucine on the basis
of the strain E. coli K-12. EFFECT: high
yield of L-leucine and resistance of new
strains to L-leucine. 3 ex

R U
2 1 4 0 4 5 0
C 1

R U ? 1 4 0 4 5 0 C 1



(19) RU (11) 2 140 450 (13) С1
(51) МПК⁶ С 12 Н 1/20, С 12 Р 13/06//С
12 Н 1/20, С 12 Р 1:19)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97117875/13, 29.10.1997

(46) Дата публикации: 27.10.1999

(56) Ссылки: JP 62-34397, 15.10.87. Appl.
Environ. Microbiol., 1986, 51, p.1024.

(98) Адрес для переписки:
113545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д.1, ГНИИ
Генетика

(71) Заявитель:
Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов

(72) Изобретатель: Гусятинер М.М.,
Лунц М.Г., Ивановская Л.В., Ростова
Ю.Г., Бачина Т.А., Ахвердян В.З., Хургес
Е.М., Лившиц В.А., Козлов Ю.И., Дебабов В.Г.

(73) Патентообладатель:
Закрытое акционерное общество
"Научно-исследовательский институт
"Аджиномото-Генетика" (ЗАО "АГРИ")

(54) ШТАММ БАКТЕРИИ ESCHERICHIA COLI ПРОДУЦЕНТ L-ЛЕЙЦИНА (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологической промышленности. Путем селекции штаммов, устойчивых к L-валину, 4-азалейцину, 3-гидроксилейцину и L-лейцину, из E.coli K-12 созданы новые

штаммы E.coli ВКПМ В-7386 и E.coli ВКПМ В-7388, производящие L-лейцин. Преимущество изобретения заключается в высокой продуктивности новых штаммов по L-лейцину и их устойчивости к нему. 2 с.п.ф.-лы.

RU
2 1 4 0 4 5 0
C 1

RU
2 1 4 0 4 5 0
C 1

RU 2140450 C1

Изобретение относится к микробиологической промышленности, к способу производства L-лейцина и касается новых штаммов - продуцентов L-лейцина, принадлежащих роду *Escherichia*. L-лейцин - незаменимая аминокислота, которая может быть использована как питательная добавка к пищевым продуктам и кормам животных, а также как компонент питательных смесей и реактивов в медицинской, фармацевтической или химической промышленности, как ростовой фактор для производства других аминокислот, таких как лизин.

Известны способы получения L-лейцина путем ферментации с использованием главным образом микроорганизмов рода *Brevibacterium*, *Corynebacterium* или *Serratia* или их мутантов, производящих L-лейцин (Amino acid fermentation, JAPAN SCIENTIFIC SOCIETY'S PRESS, pp. 397-442, 1986). Уровень накопления L-лейцина с использованием *Brevibacterium flavum* VKPM B-2736 достигает 26 г/л на среде с сахарозой за 72 часа ферментации в лабораторном ферментере (авторское свидетельство СССР 1394711). Наиболее высокий уровень накопления L-лейцина был получен с использованием *Brevibacterium lactofermentum*, который продуцировал до 34 г/л L-лейцина на среде с глюкозой (Appl. Environ. Microbiol., 51, p. 1024 (1986)).

Микроорганизмы рода *Escherichia* перспективны в качестве потенциальных продуцентов L-лейцина благодаря их быстрому росту, большому количеству данных генетического анализа и возможностям генетического конструирования. Однако имеется немного публикаций, касающихся продукции L-лейцина с использованием этих бактерий.

Известны штаммы рода *Escherichia*, устойчивые к бета-тиенилаланину и бета-оксилипину, производящие 1,25 и 1,4 г/л лейцина (патент Японии N 62-34397), и штаммы, устойчивые к 4-азалейцину или к 5,5,5-трифторлейцину (выложенная японская заявка N 870879). Однако не известны ни бактерии рода *Escherichia*, устойчивые к L-лейцину, ни связи между устойчивостью к L-лейцину и продуктивностью L-лейцина.

В качестве прототипа нами рассматривается штамм рода *Escherichia*, описанный в патенте Японии N 62-34397. Недостатком штамма является его низкая продуктивность.

Нашей задачей является создание новых более продуктивных штаммов - продуцентов L-лейцина рода *Escherichia*. В результате исследований авторы обнаружили, что приданье свойства устойчивости к L-лейцину бактериям рода *Escherichia* усиливает продукцию L-лейцина, что позволило создать предлагаемое изобретение.

Данное изобретение представляет собой бактериальные штаммы, которые принадлежат к роду *Escherichia*, которые производят L-лейцин и устойчивы к нему.

Предлагаемые новые штаммы *E.coli* 57 и *E.coli* 103, устойчивы L-лейцину, а также к аналогам лейцина, 4-азалейцину и 3-гидроксилейцину. Новые штаммы накапливают на среде с глюкозой 1,5-1,7 г/л лейцина за 48 часов культивирования.

Новые штаммы *Escherichia coli* 57 и *Escherichia coli* 103 депонированы во

Всероссийской коллекции микроорганизмов и имеют регистрационные номера ВКПМ В-7386 и ВКПМ В-7388 соответственно.

Получение лейцина с помощью предлагаемых штаммов осуществляется путем культивирования бактерий в ферментационной среде с последующим выделением L-лейцина из ферментационной среды известными способами.

Новые штаммы *Escherichia coli* 57 и *Escherichia coli* 103 не имеют существенных различий в культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаках и поэтому описаны вместе.

Морфология клеток. Грамотрицательные слабоподвижные палочки с закругленными концами 1,5-2,0 мкм в длину.

Культуральные признаки. Мясопептонный агар. Через 24 часа роста при 37°C образует беловатые полупрозрачные колонии диаметром 1,5-2,5 мм; поверхность колоний гладкая, края ровные, структура однородная, консистенция пастообразная, легко сусpendingируется в воде.

Агар Лурия. Через 24 часа роста при 37°C образует беловатые полупрозрачные колонии диаметром 1,5 - 2,5 мм; поверхность колоний гладкая, края ровные, структура однородная, консистенция пастообразная, легко сусpendingируется в воде.

Агаризованная среда M9. Через 40-48 часов роста при 37°C образует серовато-беловатые полупрозрачные, слегка выпуклые с блестящей поверхностью колонии диаметром 0,5-1,5 мм.

Рост в мясопептонном бульоне. После 24 часов роста - сильное помутнение, характерный запах. Физиолого-биохимические признаки. Рост по уколу в мясопептонном агаре. Хороший рост по всему уколу. Микроорганизм является факультативным анаэробом. Желатину не разжижает. Индола не образует.

Среда культивирования может быть синтетической или природной, включающей источник углерода и азота, а также минеральные соли и, если необходимо, нужные количества питательных веществ, в которых нуждаются используемые штаммы.

В качестве источников углерода могут использоваться один или более углеводов, таких как глюкоза и сахароза и различные органические кислоты. В определенных условиях можно использовать спирты, например этианол и глицерин.

В качестве источника азота можно использовать различные соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, а также и другие содержащие азот вещества, такие как амины; природные источники азота, такие как пептон, соевый гидролизат и ферментативный гидролизат бактерий.

В качестве минеральных солей можно использовать фосфаты калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфаты железа и марганца, мел.

Культивирование лучше проводить в aerobicных условиях при температуре 20 - 40 °C. Оптимальной является температура 30 - 38°C. Растут при pH среды 5,0 до 9,0. Предпочтительным является pH 6,5 - 7,2. pH может быть установлен аммиаком, мелом, различными кислотами, основаниями и буферами. Обычно культивирование в течение 1 - 3 дней приводит к накоплению

R U 2 1 4 0 4 5 0 C 1

целевого лейцина в культуральной жидкости. Получение штамма *Escherichia coli*, продуцирующего лейцин поясняется ниже.

Предлагаемое изобретение создано в целях получения штамма бактерий, способного к повышенному уровню продукции лейцина, что обеспечит эффективное и экономически выгодное производство лейцина.

В результате тщательных исследований, направленных на достижение поставленной цели, данные авторы установили, что приданье бактериям рода *Escherichia* устойчивости к L-лейцину улучшает продукцию лейцина, что и является сутью подхода к получению штамма, продуцирующего лейцин.

Таким образом, данное изобретение - это штамм рода *Escherichia*, способный продуцировать лейцин и устойчивый к этой аминокислоте.

Кроме того, в настоящем изобретении штамм устойчив также к аналогам лейцина. Примерами таких аналогов могут быть 4-азалейцин, 3-гидроксилейцин, бета-2-тиенилаланин и 5,5,5-трифторлейцин и т.п., но предпочтительнее использовать 4-азалейцин и 3-гидроксилейцин. При этом отдельно проводят селекцию мутантов, устойчивых лейцину и его аналогам.

Штамм, настоящего изобретения, продуцирующий лейцин и относящийся к роду *Escherichia*, устойчив к L-лейцину. Примером бактерий рода *Escherichia* может служить кишечная палочка *Escherichia coli* (E.coli). Примером бактерии, рода *Escherichia*, способной к продукции лейцина, могут служить бактерии, резистентные к бета-2-тиенилаланину, 3-гидроксилейцину, 4-азалейцину и 5,5,5-трифторлейцину, описанные в патенте Японии N. 62-34397 и выложенной японской заявке на патент N. 8-70879, а также бактерии, которые могут быть получены с помощью техники генной инженерии, как это описано в международной заявке WO96/06926. Штамм из рода *Escherichia* по предлагаемому изобретению можно получить путем отбора устойчивого к лейцину мутанта, используя в качестве родительского штамм из рода *Escherichia*, уже обладающего способностью к продукции лейцина. Или же, штамм из рода *Escherichia* по предлагаемому изобретению можно получить путем отбора мутантов, способных к продукции лейцина, используя в качестве родительского штамма бактерии рода *Escherichia*, устойчивые к лейцину. Наиболее предпочтительным является использование в качестве родительского штамма бактерий из рода *Escherichia*, который затем получает устойчивость к аналогу(ам) лейцина.

Бактерии, рода *Escherichia* синтезируют лейцин в биосинтетическом пути, в котором синтез собственно лейцина ответствуется от 2-кетоизовалериата, который одновременно является непосредственным предшественником L-валина в биосинтетическом пути L-валина. В бактериях *Escherichia* биосинтез валина и лейцина осуществляется группами ферментов, кодируемых опероном *ilvGMDA* и *leuACBD* соответственно.

Лейциновый оперон состоит из генов *leuA*, *leuB*, *leuC* и *leuD*. Из них ген *leuA* кодирует альфа-изопропилмалатсинтазу, *leuB* кодирует

бета-изопропилмалатдегидрогеназу, *leuC* и *leuD* кодируют альфа-изопропилмалатизомеразу. Из

- 5 указанных ферментов альфа-изопропилмалатсинтаза катализирует синтетическую реакцию получения альфа-изопропилмалата из альфа-кетоизовалериата, альфа-изопропилмалатизомераза катализирует реакцию изомеризации альфа-изопропилмалата с образованием бета-изопропилмалата, бета-изопропилмалатдегидрогеназа катализирует дегидрогенизацию бета-изопропилмалата с образованием альфа-кетоизокапрата, который является непосредственным предшественником лейцина. Реакция аминирования альфа-кетоизокапрата с образованием лейцина катализируется трансаминазой. Бактерии рода *Escherichia* обладают четырьмя видами трансаминаз, а именно трансаминаза А (аспартат-глутамат аминотрансфераза) кодируется геном *aspC*, трансаминаза В (аминотрансфераза разветвленных аминокислот) кодируется геном *ilvE*, который входит в состав оперона *ilvGMDA*, трансаминаза С (аланин-валин аминотрансфераза) кодируется геном *avtA* и трансаминаза Д (тироzinовая аминотрансфераза) кодируется геном *tyrB*. Эти ферменты участвуют в различных реакциях аминирования. Среди них трансаминазы В и D катализируют вышеупомянутую реакцию аминирования альфа-кетоизокапрата в L-лейцин. Трансаминазы В и С катализируют конечный этап синтеза валина, предшествующие этапы которого являются общими для биосинтеза валина и лейцина.
- 10 Из реакций биосинтеза лейцина, узким местом является стадия, катализируемая изопропилмалатсинтазой, которая подвержена ретроингибираванию L-лейцином. Экспрессия оперона *leuACBD* подавляется L-лейцином. Экспрессия генов *ilvBN*, кодирующих синтазу 1 ацетогидроксикислот, подвержена репрессии L-лейцином и L-валином совместно. Экспрессия генов *ilvGM*, кодирующих синтазу 2 ацетогидроксикислот, подвержена репрессии L-изолейцином, L-валином и L-лейцином совместно. Экспрессия генов *ilvIH*, кодирующих синтазу 3 ацетогидроксикислот, подвержена репрессии L-лейцином.
- 15 Альфа-изопропилмалатсинтаза, которая ингибируется L-лейцином, который также репрессирует экспрессию оперона *leuACBD*, участвует только в синтезе лейцина. Поэтому вышеупомянутые ингибирование и репрессия не вызывают никакого дефицита других веществ даже при избытке лейцина. Более того, хотя экспрессия генов *ilvIH* подавляется, не происходит подавления экспрессии генов *ilvBN* и *ilvGM*, кодирующих другие изоферменты. Таким образом, избыток лейцина не должен влиять на рост клеток, однако авторы данного изобретения показали, что рост клеток подавляется при избытке L-лейцина. Кроме того, авторам предлагаемого изобретения удалось повысить продукцию лейцина бактериями рода *Escherichia* при приобретении ими устойчивости к L-лейцину.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

R
U
2
1
4
0
4
5
0

C
1

C 1 4 0 4 5 0 C 1

Метод, которым получают штаммы рода *Escherichia*, устойчивые к L-лейцину, а также метод получения штаммов рода *Escherichia*, устойчивых к аналогам лейцина, объясняются ниже.

Бактерии рода *Escherichia*, устойчивые к L-лейцину, могут быть получены при культивировании в минимальной среде, содержащей L-лейцин в концентрациях, вызывающих ингибирование роста. Под ингибированием роста понимают его замедление или полную остановку. Отбор мутантов можно производить однократно или многократно. Концентрация L-лейцина в среде не лимитируется, например, 1 г/л или более, но предпочтительно от 1 до 20 г/л. Бактерии рода *Escherichia* могут быть предварительно обработаны мутагеном. Мутации могут быть получены при использовании ультрафиолетового облучения или обработкой мутагеном, обычно используемым для мутагенеза, например N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НТГ) или азотистой кислотой и другими.

Бактерии рода *Escherichia*, устойчивые к L-лейцину, полученные, как описано выше, могут расти в присутствии L-лейцина в концентрациях, которые ингибируют родительский штамм.

Как упоминалось выше, в биосинтезе лейцина есть несколько регулируемых этапов. Поэтому одиночная мутация, которая вызывает устойчивость к лейцину, может влиять на продукцию L-лейцина, но лучше, если две или более мутаций устроят полнее регуляцию биосинтеза. Штамм рода *Escherichia* с единственной мутацией может быть использован для селекции, производящего лейцин штамма, даже если его способность к продукции лейцина очень низка. Штамм рода *Escherichia*, устойчивый к аналогу лейцина, может быть получен культивированием бактерий в минимальной среде, содержащей аналог лейцина в концентрации, которая ингибирует рост, с последующим отбором выросших штаммов. Примерами аналогов лейцина являются 4-азалейцин; 3-гидроксилейцин, альфа-тиенилаланин, 5,5,5-трифторлейцин и им подобные, преимущественно 4-азалейцин и 3-гидроксилейцин.

Селекция устойчивых к аналогам лейцина мутантов может осуществляться с помощью одного или нескольких аналогов. Селекция мутантов может осуществляться в один или более этапов для одного типа аналогов.

Количество используемого аналога лейцина в среде зависит от типа аналога, но обычно составляет 0,1 г/л или более в случае 4-азалейцина или 3-гидроксилейцина. Бактерии рода *Escherichia* можно подвергать обработке мутагеном перед селекцией, как это описано выше.

При селекции устойчивых к аналогу лейцина или самому лейцину бактерий рода *Escherichia* приемлема любая последовательность.

В случае использования *E.coli* K-12 или его производных в качестве бактерий рода *Escherichia* предпочтительно получение устойчивости к L-валину в дополнении к устойчивости к L-лейцину и/или его аналогам. У штамма K-12 не выражается активный изофермент 2 синтазы ацетогидроксикислот, так как мутация сдвига рамки считывания

находится в гене *ilvG*, кодирующем большую субъединицу этого изофермента (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 922-925, 1981).

Изофермент 2 не подвержен ретроингибираванию L-валином, тогда как другие изоферменты (1 и 3) подвержены ретроингибираванию L-валином. Поэтому штамм K-12 не может расти в присутствии избытка L-валина, так как биосинтез лейцина подавляется. Таким образом, чтобы получить продуцирующий лейцин мутант из штамма K-12, желательно использовать штамм, в котором есть мутация в гене *ilvG*, которая восстанавливает рамку считывания в этом гене, в результате чего восстанавливается активность синтазы ацетогидроксикислот. Штамм с такой реверсией в гене *ilvG* будет устойчив к L-валину (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 922-925, 1981). Устойчивый к L-валину штамм K-12 может быть получен культивированием в минимальной среде, содержащей L-валин с последующим отбором выросших штаммов, как и в случае получения устойчивых к лейцину или его аналогам штаммов.

Однако если бактерии рода *Escherichia* обладают синтазой ацетогидроксикислот, которая не ингибируется L-валином, то нет необходимости получать мутанты, устойчивые к L-валину.

У бактерий рода *Escherichia*, предлагаемого изобретения активность одного или нескольких ферментов путем биосинтеза лейцина может быть увеличена в результате обычной обработки мутагеном или с помощью техники генетической инженерии. Такое увеличение активности ферментов может быть осуществлено введением в бактерии рода *Escherichia* плазиды, бактериофага или транспозона, содержащих рекомбинантную ДНК, которая получена путем вставки фрагмента ДНК, содержащей часть или весь оперон *ilvGMDA* и/или оперон *leuACBD*.

Определение нуклеотидной последовательности оперона *leuACBD* описано в *Nucleic Acid Res.*, 20, 3305-3308 (1992). Полная последовательность оперона *leuACBD* имеется в базе данных (DDBJ accession no. D10483, Internet address of DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>). Фрагмент ДНК, содержащий оперон *leuACBD*, может быть получен амплификацией фрагмента ДНК методом ПЦР (полимеразная цепная реакция, White T.J. et al. *Trends Genet.*, 5, 185, 1989), в котором олигонуклеотиды из последовательности, упомянутой выше, используются в качестве праймеров, а хромосомная ДНК бактерии рода *Escherichia* используется в качестве матрицы для ПЦР. Или же оперон *leuACBD* может быть получен с помощью скрининга библиотеки хромосомной ДНК бактерий, принадлежащих роду *Escherichia*, путем гибридизации с олигонуклеотидными зондами, полученными на основе указанных выше последовательностей.

Полная нуклеотидная последовательность оперона *ilvGMDA* и прилегающего к нему района описана в *Nucleic Acid Res.*, 15, 2137-2155 (1987) и в *Gene*, 97, 21-27 (1991) соответственно. Фрагмент ДНК, содержащий оперон *ilvGMDA*, может быть получен методом ПЦР или с помощью гибридизации, используя олигонуклеотидный зонд или

праймеры, полученные на основе описанной выше последовательности. В случае использования *Escherichia coli* K-12 или его производных, чтобы получить оперон *ilvGMEDA*, предпочтительнее использовать штамм с мутацией в гене *ilvG*, в котором восстановлена рамка считывания так, что активность синтетазы ацетогидроксикислот восстановлена. Метод получения оперона *ilvGMEDA* и метод амплификации оперона в клетке бактерий рода *Escherichia* полностью описаны в международной заявке WO96/06926 и Fr 2627508 соответственно.

Бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, данного изобретения может быть использована как штамм продуцент L-лейцина и/или как родительский штамм для селекции такого штамма. Настоящее изобретение дает возможность получать L-лейцин с большей эффективностью по сравнению с известным методом получения L-лейцина с помощью бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*.

Данное изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Селекция штаммов *E. coli*, устойчивых к L-лейцину.

Отбор штаммов, устойчивых к L-лейцину. Штаммы, устойчивые к L-лейцину и его аналогу, сконструированы из стандартного лабораторного штамма дикого типа *E. coli* K-12 путем ступенчатой селекции, как описано ниже. Мутант по каждой устойчивости отбирают из спонтанных мутантов. А именно *E. coli* K-12 или его мутант высевают на agar, содержащий L-лейцин или его аналог в различных концентрациях, указанных ниже. Затем отбирают выросший штамм.

Вначале до отбора штаммов, устойчивых к L-лейцину или его аналогу, отбирали мутантный штамм, устойчивый к 5 г/л L-валину, и получили штамм B-5 (Val-r). Из этого штамма получали мутантный штамм, устойчивый к 1 г/л L-лейцина, и обозначили его N 325 (Val-r, Leu-r). Затем мутантный штамм, устойчивый к 0,1 г/л 4-аза-D,L-лейцина (далее - 4-азалейцин), отбирали из штамма N 325 и получили штамм N 244 (Val-r, Leu-r, AL-r). Из штамма N 244 получали штамм, устойчивый к 20 г/л 4-азалейцина, и получили штамм N 70 (Val-r, Leu-r, AL-r). Символы Val-r, Leu-r, AL-r обозначают штамм с устойчивостью к L-валину, L-лейцину или 4-азалейцину соответственно. Символ AL-r относится к штамму, в который дважды вводили устойчивость к азалейцину.

Взаимосвязь между устойчивостью к L-лейцину и продукцией L-лейцина.

Чтобы определить взаимосвязь между устойчивостью к L-лейцину и продукцией L-лейцина, были получены спонтанные мутанты штамма N 70, устойчивые к 15 г/л L-лейцина, методом, описанным выше. Семь случайных колоний штамма 70 и 10 случайно отобранных, устойчивых к лейцину мутантов штамма 70 сравнивали по продукции

L-лейцина. Оказалось, что каждый из устойчивых к лейцину мутантов штамма N 70 превышал по продуктивности родительский штамм. Среднее увеличение продуктивности составило 60%.

Пример 2. Получение мутантов *E. coli* K-12, продуцирующих L-лейцин.

Штаммы, продуцирующие L-лейцин, получали ступенчатой селекцией штаммов, устойчивых к L-валину, 4-азалейцину, 3-гидроксилейцину и L-лейцину из *E. coli* K-12, как описано ниже. Штаммы *E. coli* K-12 высевали на agar с L-валином или аналогом лейцина или L-лейцином в различных концентрациях, указанных ниже. Затем отбирали выросший штамм.

Мутантный штамм, устойчивый к 5 г/л L-валина, отобрали из *E. coli* K-12 и получили штамм N 101 (Val-r), который не синтезировал L-лейцин. Из штамма N 101 получили мутант, устойчивый к 4-азалейцину в концентрации 1,3 г/л. Полученный штамм N 51 (Val-r, AL-r) синтезировал 0,05-0,1 г/л лейцина. Затем штамм с устойчивостью к 2 г/л 3-гидрокси-D,L-лейцину (далее гидроксилейцин) получали из штамма N 51 и отобрали штамм N 4 (Val-r, AL-r, Nleu-r).

Символ Nleu-r относится к штамму с устойчивостью к гидроксилейцину. Штамм N 4 синтезировал больше лейцина (около 0,4-0,6 г/л).

Штамм N 4 обрабатывали НТГ и отобрали мутанты с устойчивостью к 15 г/л L-лейцина. В результате получили два мутантных штамма N 57 и N 103 (Val-r, AL-r, Nleu-r). Продукция лейцина этими штаммами составляла 1,5-1,7 г/л.

Указанные штаммы 4, 57 и 103 были заложены во Всероссийскую коллекцию промышленных микробов (Москва 113545, 1 Дорожный проезд, 1) на условиях Будапештского договора под указанными ниже коллекционными номерами: ВКПМ B-7387, ВКПМ B-7386, ВКПМ B-7388 соответственно.

Пример 3. Получение L-лейцина с использованием штаммов *E. coli* 57 и 103.

Клетки штаммов *E. coli* 57 и *E. coli* 103 выращивают при 37°C в течение 30 часов на агаризованной среде M9. Культуры засевают петлей в качалочные колбы объемом 250 мл, содержащие по 15 мл ферментационной среды следующего состава (%): глюкоза - 6; сульфат аммония - 1,5; гидрофосфат калия - 0,15; сульфат магния семиводный - 0,1; тиамин - 100 мкг/л; мел - 2,0.

Культивирование проводят при 32 °C в течение 48 часов на качалке, скорость вращения которой составляет 250 об/мин. Продукция лейцина для штамма 57 составила 1,5 г/л, для штамма 103 - 1,7 г/л.

Формула изобретения:

1. Штамм бактерий *Escherichia coli* ВКПМ B-7386 - продуцент L-лейцина.
2. Штамм бактерий *Escherichia coli* ВКПМ B-7388 - продуцент L-лейцина.